

Title	GPR40 activation initiates store-operated $\text{Ca}^{2+}$ entry and potentiates insulin secretion via the IP3R1/STIM1/Orai1 pathway in pancreatic $\beta$ -cells( Abstract_要旨 )
Author(s)	Usui, Ryota
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2020-03-23
URL	<a href="https://doi.org/10.14989/doctor.k22360">https://doi.org/10.14989/doctor.k22360</a>
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	臼井 亮太
論文題目	GPR40 activation initiates store-operated Ca <sup>2+</sup> entry and potentiates insulin secretion via the IP3R1/STIM1/Orai1 pathway in pancreatic β-cells. （膵β細胞における GPR40 活性化は IP3R1/STIM1/Orai1 経路を介してストア作動性カルシウム流入を誘導し、インスリン分泌を増強する）		
（論文内容の要旨）			
【背景と目的】膵β細胞上に高発現している GPR40 は、ホスホリパーゼ C(PLC)を活性化し、イノシトール三リン酸(IP3)およびジアシルグリセロール(DAG)を産生する。IP3 は、小胞体（ER）からの Ca <sup>2+</sup> 放出を促進することでグルコース応答性インスリン分泌（GIIS）を増強するとされているが、その詳細なメカニズムについては明らかでない。近年、ストア作動性カルシウム流入（SOCE）と呼ばれる新たな Ca <sup>2+</sup> 流入機構が存在することが示され、その生理学的意義に関心が高まっているが、膵β細胞の GPR40 シグナルにおける SOCE の意義は全く検討されていない。そこで GPR40 シグナルによる GIIS 増強における SOCE の影響および SOCE の鍵因子である STIM1 の生体内での影響を検討した。			
【方法】膵β細胞株 MIN6 細胞を用いて IP3 受容体（IP3R）のサブタイプの一つである IP3R1、STIM1 およびその下流シグナルである Orai1 に対して siRNA によるノックダウンを行い、インスリン分泌実験及び細胞内 Ca <sup>2+</sup> 測定を行った。さらに Cre/loxP 系を用いて膵β細胞特異的に STIM1 を欠損させたマウス（βSTIM1cKO）を作出し、経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)を行うと共に、同マウス由来の単離膵島を用いてインスリン分泌実験、細胞内 Ca <sup>2+</sup> 測定を行った。GPR40 活性化には fasiglifam（fas）を用いた。			
【結果】マウス単離膵島において、IP3R 阻害薬である xestospongin C は GIIS には影響せず、fas による GIIS 増強作用は消失した。MIN6 細胞における IP3R1 のノックダウンも同様に GIIS には影響せず、fas による GIIS 増強作用、細胞内 Ca <sup>2+</sup> 上昇を有意に減弱させた。一方で細胞外 Ca <sup>2+</sup> 非存在下では fas による細胞内 Ca <sup>2+</sup> 上昇作用は著しく減弱し、GPR40 シグナルの作用には SOCE を含めた細胞外からの Ca <sup>2+</sup> 流入が重要であると考えられた。さらに STIM1 及び Orai1 のノックダウンにより SOCE は著しく低下し、IP3R1 のノックダウンと同様に GIIS を障害することなく、fas による GIIS 増強作用、細胞内 Ca <sup>2+</sup> 上昇を有意に減弱させた。この現象は長鎖脂肪酸であるパルミチン酸を用いた実験でも同様に再現された。βSTIM1cKO マウスは、コントロールと比較して、体重及び随時血糖に有意な変化を示さず、膵島の形態、β細胞量にも変化を認めなかった。βSTIM1cKO マウス由来の単離膵島では、コントロールマウスに比して SOCE は著明に障害されていた。また MIN6 細胞における検討と同様に、GIIS は障害されず、fas による GIIS 増強作用、細胞内 Ca <sup>2+</sup> 上昇を有意に減弱させた。さらに、βSTIM1cKO マウスでは OGTT にて、fas 非投与下ではコントロールマウスと同様の血糖推移を認める一方、fas による血糖改善効果は有意に減弱しており、インスリン分泌はコントロールマウスでは fas 投与により有意に増加した一方、βSTIM1cKO マウスでは有意な差を認めなかったことから、生体内においても STIM1 の欠損により GPR40 シグナルが障害されていると考えられた。			
【結語】膵β細胞において IP3R1/STIM1/Orai1 経路を介して誘導される SOCE			

は、GPR40 シグナルによるインスリン分泌増強作用に重要な役割を担っていることが明らかになった。	
(論文審査の結果の要旨)	
膵β細胞に高発現している GPR40 刺激はグルコース応答性インスリン分泌 (GIIS) を増強するが、その詳細なメカニズムは明らかでない。申請者は GPR40 刺激による GIIS 増強におけるストア作動性カルシウム流入 (SOCE) の影響および SOCE の鍵因子である STIM1 の意義の解明に取り組んだ。	
MIN6 細胞において、IP3R1 のノックダウンにより、GPR40 作動薬 fasiglifam (fas) による GIIS 増強作用は消失した。一方で細胞外 Ca <sup>2+</sup> 非存在下では fas による細胞内 Ca <sup>2+</sup> 上昇作用は著しく減弱し GPR40 シグナルの作用には小胞体からの Ca <sup>2+</sup> 放出のみならず SOCE を含めた細胞外からの Ca <sup>2+</sup> 流入が重要であると考えられた。MIN6 細胞にて STIM1 および Orai1 をノックダウンしたところ SOCE と共に、fas による GIIS 増強作用、細胞内 Ca <sup>2+</sup> 上昇は有意に減弱した。膵β細胞特異的に STIM1 を欠損させたマウス (βSTIM1cKO) においても単離膵島およびで OGTT による検討で fas による作用が低下していたことから膵β細胞において IP3R1/STIM1/Orai1 経路を介して誘導される SOCE は、GPR40 シグナルによる GIIS 増強作用に重要な役割を担っていることが明らかになった。	
以上の研究はインスリン分泌機序の解明に貢献し代謝学及び糖尿病学の発展に寄与するところが多い。	
したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。	
なお、本学位授与申請者は、令和2年3月4日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。	

